

PENGARUH PENAMBAHAN STARTER DAN WAKTU INKUBASI: DARK COKLAT (*Theobromo cacao L.*) TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KUALITAS MINUMAN PROBIOTIK

*(Effect of Addition of Starter and Incubation Time: Dark Chocolate
(Theobromo cacao L.) on Antioxidant Activity and Probiotic Quality)*

Hani Mulyani^{a*}, Andini Sundowo^a, Euis Filaila^a, Teni Ernawati^a

^aResearch Center for Chemistry, Indonesian Institute of Sciences

* Penulis korespondensi

Email: hmulyani@yahoo.com

ABSTRACT

In milk fermentation process were converted of lactose to lactic acid by lactic acid bacteria (LAB). Concentration of starter and fermentation time were used will affect the speed of lactose remodeling into lactic acid. The aim of this study were to determine the effect of fermentation process in probiotic dark chocolate. In this study, the fermentation process were carried out with variety of concentration starter LAB: 1, 5, 10, 15 and 20%. And also we investigated the duration of fermentation process at 24 h and 48 h. The parameters were tested from fermentation process results are pH, lactose, lactic acid, dissolved protein concentration, Lactose and lactic acid testing was carried out by using the HPLC, testing of soluble proteins concentration by using Lowry method. The highest lactose and lactic acid were obtained from fermentation with a variation of 15% starter LAB concentration in fermentation time for 24 h. The results of % inhibition analysis on yogurt with a concentration of 10% stater and 48 hours fermentation time without the addition of dark chocolate and the addition of dark chocolate showed the highest% inhibition of antioxidants compared to the others 20,84 % and 95.58%. The variety of concentration starter LAB and the length of the fermentation process did not affect pH and dissolved protein levels.

Keywords: *antioxidant, probiotic, dark chocolate, lactose*

ABSTRAK

Pada pembuatan yogurt terjadi konversi gula susu (laktosa) menjadi asam laktat melalui proses fermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL). Konsentrasi stater dan waktu fermentasi yang digunakan akan mempengaruhi kecepatan perombakan laktosa menjadi asam laktat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan stater dengan variasi sebesar : 1, 5, 10, 15 dan 20% dan waktu fermentasi pada 24 jam dan 48 jam terhadap asam laktat. Parameter yang diuji diantaranya adalah pH, kadar laktosa, kadar protein, kadar asam laktat, dan aktivitas antioksidan. Parameter yang diuji dari hasil proses fermentasi adalah pH, laktosa, asam laktat, protein terlarut. Pengujian laktosa dan asam laktat dilakukan dengan menggunakan HPLC, pengujian konsentrasi protein terlarut dengan menggunakan metode Lowry. Asam laktosa dan asam laktat tertinggi diperoleh dari fermentasi dengan variasi konsentrasi BAL starter 15% dalam waktu fermentasi selama 24 jam. Hasil analisis % inhibisi pada yogurt konsentrasi stater 10% dan waktu fermentasi 48 jam tanpa penambahan dark coklat dan penambahan dark coklat menunjukkan % inhibisi antioksidan paling tinggi dibandingkan dengan yang lainnya sebesar 20,84 % dan 95,58%. Hasil penelitian Variasi starter konsentrasi BAL dan lamanya proses fermentasi tidak mempengaruhi pH dan kadar protein terlarut.

Kata kunci: antioksidan, probiotik, dark coklat, laktosa

PENDAHULUAN

Susu merupakan bahan pangan yang mempunyai nilai gizi tinggi karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap seperti laktosa, lemak, protein, berbagai vitamin, dan mineral. Susu mudah rusak oleh mikroorganisme, untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan pengolahan dan pengawetan, antara lain dengan fermentasi susu menjadi yoghurt. Pada proses fermentasi yogurt dapat digunakan konsentrasi stater bakteri asam laktat (BAL) dan waktu fermentasi akan berpengaruh pada kualitas fermentasi yogurt yang dihasilkan (Agus Safari, 2016).

Pada proses fermentasi yogurt dapat digunakan kultur tunggal atau campuran dari bakteri asam laktat BAL mempelajari simbiosis dua kultur bakteri asam laktat yang sering digunakan pada proses fermentasi yogurt, yaitu *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Bakteri asam laktat *L. bulgaricus* menghasilkan asam-asam amino untuk pertumbuhan *S. thermophilus*, sedangkan *S. thermophilus* menghasilkan asam formiat yang digunakan untuk pertumbuhan *L. bulgaricus* (Rajagopal & Sandine 1988).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bakteri probiotik dapat bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Sayangnya, meskipun *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* termasuk bakteri probiotik, namun kedua bakteri ini tidak dapat lolos dari berbagai kondisi dalam saluran pencernaan sehingga tidak dapat mencapai usus dalam keadaan masih hidup (Agus safari, 2016). *L. bulgaricus* tidak dapat bertahan dalam usus namun dapat bertahan sekitar tiga jam setelah masuk ke dalam usus bersama yogurt yang diminum. Sedangkan *S. thermophilus* sama sekali tidak tahan hidup dalam usus manusia (Goldin *et al.* 1992). Oleh karena itu dalam penelitian ini, untuk menambah efek fungsional bagi kesehatan, produk yogurt ditambahkan dengan *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium*. Kedua bakteri ini merupakan bakteri probiotik yang memiliki sifat lebih baik (Gomes & Malcata, 1999).

Kualitas yogurt yang baik umumnya dilihat dari kadar laktosa yang rendah karena telah diubah menjadi asam laktat, sehingga nilai pH yogurt menjadi rendah pula. Untuk mendapatkan kualitas yogurt yang baik, sangat tergantung pada kultur starter yang digunakan untuk membuat yogurt. (Agus Safari, 2016)

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bakteri probiotik dapat bertahan hidup dengan penambahan coklat 10% dalam proses fermentasi dapat meningkatkan aktivitas antioksidan yang signifikan. Oleh karena itu, untuk menambah efek fungsional bagi kesehatan, produk yogurt yang dihasilkan ditambahkan dengan coklat. Pada penelitian ini, dilakukan penambahan konsentrasi stater bakteri asam laktat, waktu fermentasi dan penambahan dark coklat untuk menentukan pengaruhnya terhadap kualitas yogurt yang dihasilkan dengan mempunyai aktivitas antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan antara lain adalah susu skim, susu UHT, air suling, natrium hidroksida, asam sulfat, glukosa, laktosa, *bovine serum albumin* (BSA), tembaga sulfat pentahidrat, nutrient broth, pereaksi Folin-Ciocalteu, pereaksi fosfomolibdat, kultur bakteri *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* dan *bifidobacterium*.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah inkubator, spektrofotometer UV-Vis Carry 60 Agilent, sentrifugasi, *laminar flow cabinet* (ESCO), pH meter (Mettler Toledo 8603), inkubator (Mettler), Autoklaf (Yamato sterilizer SM3 10), HPLC Alliance, waters, termometer, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Pembuatan kultur starter

Ke dalam 200 mL susu skim yang telah dipasteurisasi dalam botol dimasukkan satu ose *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* dan *bifidobacterium* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Susu hasil fermentasi merupakan kultur yang siap digunakan sebagai stater yang akan digunakan untuk penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi stater bakteri asam laktat 1, 5, 10, 15 and 20%.

Fermentasi susu

Susu UHT kemudian sebanyak 200 mL yang berbeda dimasukkan kultur starter dengan variasi stater masing-masing 1, 5, 10, 15 and 20%. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Sampel diambil pada waktu inkubasi 24 dan 48 jam. Hasil fermentasi produk yogurt ditambahkan coklat sebanyak 10%. Hasil fermentasi ini kemudian dianalisis untuk nilai pH, kadar laktosa, kadar asam laktat, kadar protein dan antioksidan.

Pengukuran pH

Sampel produk yogurt yang dihasilkan diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter.

Penentuan kadar gula laktosa dan kadar asam laktat (Metode HPLC)

HPLC yang digunakan dalam analisa gula lakosa dan asam laktat adalah HPLC collom for organic acid alalysis, Ion Exclusion HPX – 87 H 300 mm x 7,8 nm, menggunakan kolom aminex, bio rad dan detektor yang digunakan adalah detektor refraktif index. Asam laktat dianalisis dengan metode HPLC mengikuti prosedur menurut Marsili, et al (1981). 5 gram sampel dilarutkan dengan 5 mL air, ditambahkan 20 mL asetronitril dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse 50 mL, dan dikocok selama 1 menit. Kemudian disentrifuse ada 7000 rpm selama 5 menit. Supernatannya diambil 10 µL dan diinjeksikan ke HPLC. Sebagai internal standar digunakan S-lactid acid dan laktosa. Spesifikasi HPLC untuk

analisa lakosa dan asam laktat sama pada detectornya dengan panjang gelombang 210 nm.

Penentuan kadar protein

Sebanyak 0,1 mL larutan standar BSA (0,00; 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5;75; dan 87,5ppm) atau sampel yang akan ditentukan kadar proteinnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan sebanya 5 mL pereaksi Lowry C (50 mL 2% natrium karbonat dalam 0,1 N natrium hidroksida : 1 mL 0,5% tembaga sulfat pentahidrat dalam 1% natrium tartrat) dan didiamkan selama 10 menit. Sebanyak 0,5 mL larutan Folin-Ciocalteu kemudian ditambahkan, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 650 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis susu skim media fermentasi

Kultur starter dibuat dengan menggunakan susu skim sebagai media pertumbuhan BAL, sedangkan pada pembuatan yogurt digunakan susu UHT. Untuk mengetahui kualitas bahan baku pada proses pembuatan yogurt, maka dilakukan analisis kualitas yang mencakup nilai pH, kadar protein dan kadar laktosa. Hasil analisis susu skim disajikan pada Tabel 1.

Data pada Tabel 1 menunjukkan pH, kadar protein, dan kadar laktosa mempunyai kualitas baik yang dibutuhkan pada saat fermentasi. Laktosa diubah oleh bakteri asam laktat (BAL) menjadi asam laktat yang bereaksi pada protein susu untuk memberikan yogurt tekstur dan karakteristik tertentu. Laktosa merupakan senyawa gula yang terdapat dalam susu sapi dan merupakan bahan utama dari proses pembuatan yogurt menjadi asam laktat melalui proses fermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL).

Tabel 1. Nilai pH, kadar protein, dan kadar laktosa susu skim

Nama sampel	pH	Kadar protein(ppm)	Kadar laktosa (ppm)
Susu skim	6,76	9,0013	7750,00

Tabel 2. Nilai pH yogurt dengan variasi perbandingan konsentrasi starter pada dua waktu inkubasi 8 dan 10 jam

Konsentari stater (%)	pH	
	24 Jam	48 jam
1	4,73	4,66
5	4,73	4,61
10	4,60	4,50
15	4,58	4,50
20	4,57	4,47

Tabel 3 Kadar laktosa yogurt dengan variasi konsentrasi starter pada waktu Fermentasi 24 dan 48 jam.

Konsentari stater (%)	Kadar Laktosa (ppm)	
	24 Jam	48 jam
1	8132,09	8951,18
5	9341,71	8952,62
10	9137,11	9672,65
15	9204,59	9026,56
20	10151,47	9393,40

Analisis pH

Hasil pengujian nilai pH pada pembuatan yoghurt dengan menggunakan variasi konsentrasi starter bakteri asam laktat 1, 5, 10, 15 dan 20% dan waktu fermentasi pada 24 dan 48 jam disajikan pada Tabel 2. Nilai uji pH yoghurt menunjukkan penambahan starter dan waktu fermentasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pH. Hal ini berarti pembuatan yoghurt dengan menggunakan starter sampai 20% tidak memberikan pengaruh terhadap nilai pH yang dihasilkan, namun rata-rata nilai pH setiap perlakuan penambahan konsentasi starter cenderung menurun. Hasil pengujian menunjukkan nilai pH yoghurt berada dalam batas normal. Nilai pH yang didapatkan yaitu kisaran 4,47 - 4,73 dengan waktu fermentasi selama 24 dan 48 jam. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Allgeyer *et al.* (2010) bahwa pembuatan *drink yoghurt* dilakukan pada suhu fermentasi 42°C selama 5-6 jam hingga didapat pH sebesar 4,3-4,4. Selama proses fermentasi, bakteri asam laktat akan memfermentasi karbohidrat yang ada hingga terbentuk asam laktat. Pembentukan

asam laktat ini menyebabkan peningkatan keasaman dan penurunan nilai pH. Peningkatan konsentrasi starter dari 1% sampai 20% diikuti pula penurunan pH dan peningkatan kadar asam, karena peningkatan konsentrasi starter berarti peningkatan jumlah mikroba pada media. Peningkatan ini akan diikuti dengan peningkatan aktifitas serta perkembangan mikrobial dan kemudian terjadipeningkatan perombakan laktosa menjadi asam laktat yang dicerminkandengan kadar asam yoghurt.

Analisis Laktosa dan Asam laktat

Kadar laktosa ditentukan dengan metode HPLC. Hasil penentuan kadar laktosa disajikan pada Tabel 3. Hasil analisis kadar laktosa yoghurt dengan penggunaan konsentrasi starter yang berbeda 1,5,10, 15 dan 20% yang paling tinggi yaitu pada konsentrasi 20% yaitu sebesar 10151,47 ppm dan yang paling kecil pada konsentrasi 1% sebesar 8132,09 ppm. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan starter pada konsentrasi starter yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kadar

laktosa yoghurt. Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi starter yang lebih tinggi akan memperoleh kadar laktosa yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena jumlah mikrobial dalam pembuatan yoghurt yang mampu mengubah laktosa susu menjadi asam laktat. Tingkat konsentrasi starter yang digunakan juga akan mempengaruhi kecepatan perombakan laktosa pada waktu dan suhu inkubasi yang sama. Peningkatan konsentrasi starter berarti peningkatan jumlah mikrobial. Peningkatan tersebut akan diikuti dengan peningkatan aktivitas serta perkembangbiakan pada media serta kondisi yang ideal, kemudian terjadi peningkatan perombakan laktosa menjadi asam laktat. Selama proses fermentasi, laktosa susu diubah menjadi asam laktat kurang lebih sebanyak 30% sedang sisanya masih dalam bentuk laktosa (Djaafar dan Rahayu 2006). Kadar asam laktat ditentukan dengan metode HPLC. Hasil penentuan kadar asam laktat disajikan pada Tabel 4. Hasil analisis kadar asam laktat memperlihatkan nilai pengujian kadar asam laktat pada yoghurt dengan menggunakan starter dengan variasi konsentrasi yang berbeda 1,5,10, 15 dan 20% dan waktu fermentasi memberikan pengaruh terhadap kadar asam laktat. Konsentrasi starter makin tinggi dan lama waktu fermentasi kadar asam laktat makin tinggi dan mulai turun pada konsentrasi 20%. Pada umumnya pertumbuhan bakteri BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti komposisi nutrisi susu, jumlah inokulum, temperatur dan waktu inkubasi. Pada pembuatan yoghurt, bakteri *Lactobacillus bulgaricus* bersimbiosis mutualisme dengan *Streptococcus thermophilus*. Pertumbuhan *Streptococcus thermophilus* meningkat distimulir karena adanya asam amino dan peptida sederhana, terutama valin, lisin dan histidin (Widodo, 2003). Hasil degradasi protein oleh *Lactobacillus bulgaricus*,

sedangkan *Lactobacillus bulgaricus* tumbuh dengan cepat karena distimulir adanya asam format dan CO₂ yang dihasilkan oleh *Streptococcus thermophilus*. Kombinasi bakteri yoghurt akan menghasilkan asam laktat lebih cepat dibandingkan kultur tunggal. Keasaman susu meningkat dengan meningkatnya jumlah mikroorganisme yang mengubah sebagian laktosa menjadi asam laktat oleh bakteri pembentuk asam (Adnan, 1984 dalam Wahyudi M, 2006). Perbedaan keasaman yoghurt disebabkan oleh jenis starter karena setiap starter mempunyai karakteristik sendiri dalam memecah laktosa susu. Peningkatan konsentrasi starter akan diikuti pula dengan peningkatan kadar asam, karena peningkatan konsentrasi starter berarti peningkatan jumlah mikroba pada media. Peningkatan ini akan diikuti dengan peningkatan aktifitas serta perkembangan mikrobial dan kemudian terjadi peningkatan perombakan laktosa menjadi asam laktat yang dicerminkan dengan kadar asam yoghurt.

Bakteri asam laktat pada yoghurt akan memproduksi asam laktat selama proses fermentasi berlangsung. Asam laktat merupakan hasil utama metabolisme bakteri asam laktat dengan mengubah laktosa menjadi asam laktat dan akan memberikan rasa asam pada yoghurt. Asam laktat menyebabkan menurunnya nilai pH, nilai tersebut ditentukan karena adanya ion H⁺ sehingga pH semakin rendah.

Kadar Protein

Kadar protein sampel ditentukan dengan menggunakan metode Lowry *et al.* (1951). Hasil analisis kadar protein ditampilkan pada Tabel 5. Hasil analisis kadar protein dapat dilihat bahwa pada waktu inkubasi 24 dan 48 jam yogurt yang dibuat dengan empat kultur starter memiliki kadar protein tidak terlihat adanya

Tabel 4. Kadar asam laktat yogurt dengan variasi konsentrasi starter pada waktu Fermentasi 24 dan 48 jam.

Konsentari stater (%)	Kadar Asam Laktat (ppm)	
	24 Jam	48 jam
1	10,3452	13,4515
5	13,0401	13,5230
10	14,9169	15,4550
15	14,0641	14,3855
20	12,6543	13.0014

Tabel 5. Kadar protein yogurt dengan variasi konsentrasi starter pada fermentasi 24 dan 48 jam.

Konsentrasi Stater (%)	Kadar protein (ppm)	
	24 Jam	48 Jam
1	9,0412	9,0674
5	8,9900	8,9749
10	8,9258	8,0282
15	8,9681	8,9829
20	8,9431	8,9817

Tabel 6. Analisis antioksidan dengan variasi konsentrasi starter pada fermentasi 24 dan 48 jam.

Konsentrasi Stater (%)	% Inhibisi	
	24 Jam	48 Jam
1	15,60	19,53
5	17,15	10,72
10	12,87	20,84
15	12,59	10,46
20	18,29	16,62

Tabel 7. Analisis antioksidan dengan variasi konsentrasi starter pada fermentasi 24 dan 48 jam dengan penambahan dark coklat 10%

Konsentrasi Stater (%)	% Inhibisi	
	24 Jam	48 Jam
1	93,66	93,17
5	93,27	93,82
10	93,80	95,58
15	93,50	93,50
20	93,31	93,08

kadar protein waku inkubasi 24 dan 48 jam menunjukkan tidak terlalu memberikan pengaruh terhadap kadar protein yogurt yang dihasilkan. Penambahan starter makin besar yogurt yang dihasilkan lebih kental hal ini disebabkan oleh nilai pH pada *yoghurt* itu sendiri, nilai masing-masing pH makin turun dari kisaran 4,73 – 4,47. Berdasarkan nilai pH yang didapatkan, perlakuan waktu inkubasi 24 dan 48 jam berada pada kisaran titik isoelektris (pH 4,6-4,7) yang merupakan awal terjadinya koagulasi, sehingga menghasilkan tekstur

yang agak kental. Protein susu (kasein) menggumpal pada titik isoelektris pH 4,7 dalam keadaan ini muatan listrik pada permukaan protein adalah nol. Pada pH 4,4 - 4,5 akan tercapai titik isoelektris protein sehingga terjadi penggumpalan. Penggumpalan yaitu suatu perubahan bentuk susu dari cair menjadi padatan. (Djaafar dan Rahayu 2006).

Uji Antioksidan

Analisis antioksidan menggunakan metode *1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*

(DPPH). Hasil Analisis antioksidan dapat dilihat pada Tabel 6. Susu fermentasi yogurt merupakan salah satu produk bahan pangan fungsional karena mengandung senyawa biopeptida β -laktoglobulin yang merupakan prekursor β -laktorpin dapat berperan sebagai antioksidan juga diklaim memiliki aktivitas antitumor dengan pemanfaatan aktivitas bakteri asam laktat (Mohamed, et al, 2014)

Hasil analisis % inhibisi pada yogurt pada konsentrasi stater 10% dan waktu fermentasi 48 jam paling tinggi dibandingkan dengan yang lainnya sebesar 20,84 %. Dilihat dari hasil analisis % inhibisi antioksidan produk yogurt yang dihasilkan masih kecil, sehingga perlu ditambahkan untuk meningkatkan minuman fungsional yang mengandung bahan-bahan yang dapat meningkatkan status kesehatan dan mencegah timbulnya penyakit tertentu. Salah satu komponen pangan fungsional yang mempunyai fungsi fisiologis bagi tubuh adalah antioksidan. Asupan antioksidan setiap hari dapat mengurangi peluang munculnya gejala penyakit degeneratif dan mampu memperlambat penuaan (Papas, 1998 dalam Septiana AT dan Dwiyantri H, 2009).

Biji kakao dari Indonesia mempunyai kandungan gugus polifenol epicatechin dan kapasitas antioksidan. Senyawa polifenol merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat antioksidan, yang sangat penting dalam peranannya menyehatkan tubuh manusia (Crozier *et al.*, 2011). Penambahan dark coklat dipilih sebagai alternatif bahan tambahan pada pembuatan yogurt adalah berdasarkan pada keperluan untuk meningkatkan sifat antioksidan pada yogurt. Hasil analisis % inhibisi antioksidan yogurt dengan penambahan dark coklat dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan analisis % inhibisi dapat diketahui bahwa penambahan dark coklat 10% dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pada produk yogurt yang dihasilkan. Penambahan konsentrasi stater dan waktu

inkubasi 24 dan 48 jam tidak berpengaruh terhadap % inhibisi antioksidan yogurt.

Hasil penelitian yogurt penambahan dark coklat menunjukkan % inhibisi antioksidan yang paling tinggi pada konsentrasi stater 10% dengan waktu inkubasi 48 jam 95,58%. Dark coklat memiliki kandungan senyawa katekin, epikatekin, prosianidin, dan bentuk senyawa polifenol (Vinson et al, 2006). Senyawa polifenol yang terkandung dalam dark coklat sangat berkontribusi terhadap karakteristik citarasa dari yogurt yang dihasilkan. Disamping itu senyawa polifenol yang terkandung dalam dark coklat sangat berkontribusi positif terhadap penjaan kesehatan tubuh manusia.

KESIMPULAN

Kadar asam laktat optimal pada penambahan stater 10% dengan waktu fermentasi 48 jam dan penambahan dark coklat 10% pada yoghurt dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Ristekdikti melalui Program Insinas Flagship Pangan LIPI tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Allgeyer LC, Miller MJ and Lee SY. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.* **93**: 4471-4479.
- Crozier SJ, Preston AG, Hurst JW, Payne MJ, Mann J, Hainly L and Miller DL. 2011. Cocoa seeds are a "Super Fruit" : A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal* 5 : 1-6.

- Djaafar T F dan Rahayu ES. 2006. Karakteristik yogurt dengan inokulum *Lactobacillus* yang diisolasi dari makanan fermentasi tradisional. *Agros*. **8** (1): 73-80.
- Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L. & Salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. **37**(1): 121-128.
- Gomes AMP & Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. **10**: 139-157.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. & Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 25-275.
- Mohamed, A.G., A. F. Zayan and Nadia, M. Shahein. 2014. Physiochemical and sensory evaluation of yoghurt fortified with dietary fiber and phenolic compounds. *Life Science Journal* **2014**;11(9):816-822. ISSN:1097-8135 <http://www.lifesciencesite.com>.
- Rajagopal SN & Sandine WE. 1988. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science* **73**: 894 – 899.
- Safari A, Rachman SD, Kamara DS, Suprijana O, Djajasoepena S, Sutrisna R, Ishmayana S. 2016. Perbandingan Kualitas Yogurt yang Dibuat dengan Kultur Dua dan Tiga Bakteri. prosiding seminar nasional kimia dan pembelajaran kimia unpad. h 95-100. <https://www.researchgate.net/publication/306011485>.
- Septiana AT dan Dwiyantri H. 2009. Aktivitas Antioksidan Minuman Fungsional dari Irisan Buah Kering Mahkota Dewa. *AGRITECH*:29(1) pp16 -21
- Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, Samman N and Agbor GA. 2006. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant an antiatherosclerotic agent in a animal model and a significant cotributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** : 8071-8076.
- Widodo W. 2003. Bioteknologi fermentasi susu. Media Bioteknologi, Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Jawa Timur. hlm.1-29.